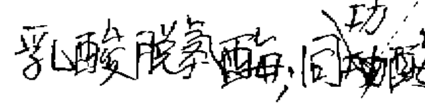
动 物 学 研 究 1994，15（2）：62—67 CN 53-1040／Q ISSN 0254-5853
Zoological Research

泰山赤鳞鱼同工酶的研究

张庆朝 王 慧 秦孜娟 曾勇庆 岳永生
（山东农业大学 泰安 271018）

摘要 采用琼脂糖凝胶电泳或聚丙烯酰胺垂直板凝胶电泳(PAGE)技术研究了泰山赤鳞鱼早期发育阶段(受精后 0—120 h)及成体眼、脑、心、肾、肝、肌 6 种组织中的 LDH 同工酶分化表达谱式。结果表明：(1)赤鳞鱼在胚胎发育过程中 Ldh-A 基因和-B 基因同时表达，形成 5 种不同形式的四聚体（B_4、AB_3、A_2B_2、A_3B、A_4）。与大多数硬骨鱼相比，赤鳞鱼 LDH 同工酶具有独特的早期个体发育谱式：在整个胚胎发育时期，A 亚基与 B 亚基的活性几乎相等。(2）赤鳞鱼的 LDH 同工酶谱具有明显的组织特异性。Ldh-C 基因仅在肝脏组织表达，以向阴极迁移的分子形式(LDH-C_4)特异地表达。

关键词 泰山赤鳞鱼，乳酸脱氢酶同工酶，电泳，个体发育谱式



乳酸脱氢酶(LDH)在动物的体细胞内一般由 A、B 两种亚基聚合成 5 种不同形式的四聚体(B_4、AB_3、A_2B_2、A_3B、A_4)(张庆朝等，1992)。这 5 种 LDH 同工酶的 A 和 B 两种亚基是由两个一般是不连锁的 Ldh-A 和-B 基因决定的，而这两个基因的表达又受到组织的组成、氧的饱和程度以及激素、压力、温度等由外环境因子的影响，产生出特定组织、特定发育时期的特异性 LDH 同工酶谱(李士鹏，1987)。在 LDH 同工酶电泳图谱上表现出种属的特异性、发育特异性及组织特异性。因此，同工酶分析已作为生物分类学、生化遗传学及发育遗传学研究的新手段。

泰山赤鳞鱼(*Varicorhinus* sp.)属鲤科、鲅亚科、突吻鱼属。是生活于泰山深处海拔 270—800 m 山涧清澈溪流中的一种野生名贵鱼种，以其肉嫩味美、营养丰富及其独特药用保健价值而闻名于世，成为久负盛名的地方特产之一。赤鳞鱼的开发利用及资源保护已引起国内渔业界的关注。山东农业大学赤鳞鱼养殖基地已将赤鳞鱼驯养及人工繁殖成功(李达，1983)。由于赤鳞鱼的种群数量少，分布区狭窄，在长期的近亲交配中难免出现混杂或退化现象，故从遗传学的角度研究赤鳞鱼的生化表现型，以便直接利用基因产物作为遗传标记，鉴定遗传变异，为品种改良和定向育种提供生化指标，同时，也为合理开发和利用赤鳞鱼资源及建立和保护人工种质资源库及基因库提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料来源及样品制备

实验所用成鱼、胚胎等材料均来自山东农业大学赤鳞鱼养殖基地。采得不同发育时期

本文 1993 年 6 月 25 日收到，同年 11 月 4 日修回

的胚胎共 150 粒，分组见表 1。成鱼(1—2 龄)共 8 尾，雌雄各半。活鱼在冰浴中断头，取出眼、脑、心、肝、肾、肌肉等组织，用缓冲液洗净后称重，按 1∶6(组织湿重∶缓冲液)分别加入 pH7.0 的 0.1 M 磷酸盐缓冲液，冰浴中用玻璃匀浆器匀浆，4℃离心 30 min，15000 rpm，取上清液保存于-20℃冰箱中备用。挑选每一发育时期特征明显的胚胎 25 粒，如上法进行处理。

表 1　赤鳞鱼早期胚胎发育时序及主要特征(水温 20—22℃)

Tab. 1　Time schedule and major morphological features of samples taken form the early developing *Varicorhinus* sp.

样品编号	发育时期	受精后时间(h)	主要形态特征
1	受精卵期	0	卵子淡黄色，具粘性，卵外粘附许多沙粒
2	囊胚期	10	分裂球很小，细胞界渐渐模糊不清，胚盘与胚黄物质交界处有一层明显的卵黄多核体
3	原肠胚期	17	胚盘细胞下包卵黄球，出现胚盾
4	尾芽期	26	胚体后端腹面出现尾芽
5	出膜期	72	胚胎在卵膜内不断转动，不久破膜而出
6	仔鱼期	120	仔鱼全长 10—10.5 mm，尾鳍分化，体色青黑，鳔充气，泄殖孔开，游泳力强

1.2　实验方法

1.2.1 聚丙烯酰胺垂直板凝胶电泳(PAGE)　参照周顺伍(1992)的方法，胶板大小 20×17×1(mm)，分离胶浓度 7.5%(pH8.8)，浓缩胶浓度为 3%(pH6.8)，电流 20 mA，电压 50 V，在 4℃条件下电泳 6 h。电极缓冲液用 Tris-Gly 溶液(pH8.3)，每个样品与 20%蔗糖溶液混合后加微量溴酚兰作指标剂，每个点样孔加 40 μl，每个样品点两个孔作重复对照。

1.2.2 染色、固定及扫描　参照李永通等(1992)方法，配制染色液，每 100 ml 染色液含 40 ml　Tris-HCl(pH6.8)，80 mg 辅酶 I(NAD^+)、50 mg　NBT 及 2 mg 吩嗪二甲酯硫酸盐(PMS)、0.5 ml 乳酸钠(10 M)和 5 mg　NaCl。电泳结束后将凝胶板取下，在 37℃染色液中避光浸染 1 h，显出紫色的酶带，用 7%的乙酸固定 2 h 以上，然后拍片及扫描。

2　结果与分析

2.1 早期发育过程中 LDH 同工酶谱变化及基因表达

赤鳞鱼早期发育过程中，可分离出 5 种 LDH 同工酶表型(见图 1)。

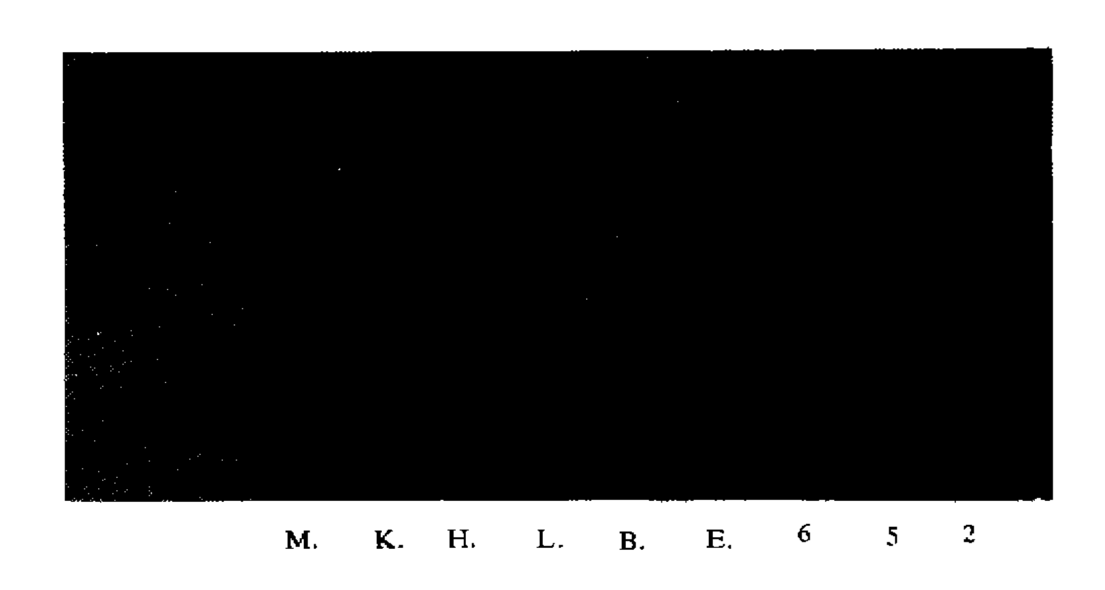
LDH 同工酶的 A 亚基和 B 亚基在早期发育过程中始终同时表达(见图 1)。扫描分析 A 亚基与 B 亚基的活性几乎相等。赤鳞鱼早期发育过程中，LDH 同工酶明显地由 Ldh-A 基因座位和-B 基因座位编码。未见 Ldh-C 基因座位表达。

2.2 赤鳞鱼 LDH 同工酶组织特异性及亚基组成

2.2.1 成体赤鳞鱼的 LDH 同工酶明显地由 3 个基因(Ldh-A，-B，-C)编码。在所分析的眼、脑、心、肾、肝、肌组织中的电泳图谱中均能显示出由 LDH-A、-B 亚基聚合而成的 5 种 LDH 同工酶带(见图 1)。而 Ldh-C 基因仅在肝脏组织中表达,以向阴极迁移的分子形式($LDH-C_4$)特异性地表达(见图 2)。

2.2.2 赤鳞鱼不同的 LDH 基因表达情况在不同的组织间有差异。对赤鳞鱼 6 种组织中的

LDH 同工酶谱进行扫描分析可知：Ldh-A 基因在主行兼气代谢的肌肉组织中占优势，而 Ldh-B 基因在供氧充足的心肌中优势表达，其次在脑和肾中也占优势。Ldh-C 基因仅在肝脏中表达。由此可见，LDH 基因在成体不同组织中的表达具有明显的组织特异性，这种特异性与各组织的代谢功能密切相关。



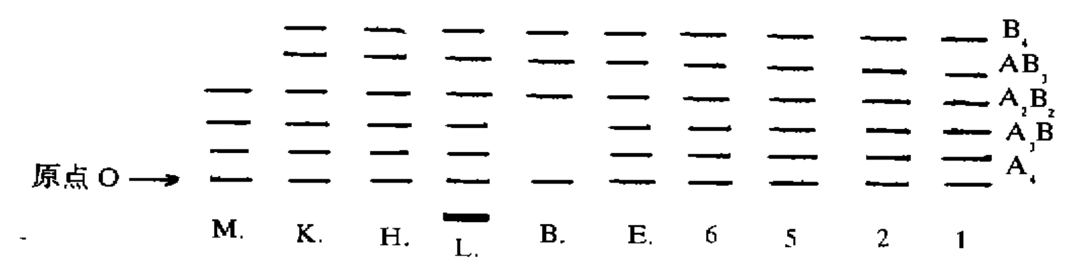


图 1　赤鳞鱼早期发育不同阶段及成体各组织 LDH 同工酶电泳图谱及其模式图(PAGE)

Fig. 1　Electrophoretogram and the model of LDH isozymes expressed during the early developmental stages and in various adult tissue of *Varicorhinus* sp. (PAGE)

M 肌肉，K 肾，H 心，L 肝，B 脑，E 眼，6 仔鱼期，5 出膜期，2 囊胚期，1 受精卵

3　讨论与结论

3.1　早期发育过程中 LDH 同工酶基因表达的模式

同工酶是生物机体的天然标记(阎龙飞等，1987)，可反映出在生长发育过程中基因如何表达。泰山赤鳞鱼的整个胚胎发育过程中，LDH-A、-B 两个亚基同时表达，A 亚基与 B 亚基活性几乎相等。这种同工酶变化谱式不同于一般鱼类的酶谱变化模式。鱼类早期发育过程中，LDH 同工酶一般是 B 亚基占优势(李思发等，1990)，LDH-A_4 直到胚胎

发育的中后期才出现。然而，Philipp 等(1979)在两种黑鲈属鱼类(*Micropterus salmoides* 和 *M. dolomieu*)中观察到完全相反的结果：这两种鱼类的未受精卵及整个胚胎发育过程中均有 A_4 活性，但其染色活性在红细胞形成期明显增加，而 B 亚基直到 A_4 活性明显增加以后才出现。赤鳞鱼早期胚胎发育过程中 LDH 基因表达模式相似于蓝绿鳞鳃太阳鱼(*Lepomis cyanellus*)。在蓝绿鳞鳃太阳鱼的整个胚胎发育过程中，LDH-A 和-B 亚基的活性几乎相等(Champion 等，1976)。泰山赤鳞鱼早期胚胎发育过程中，LDH-A、-B 两个亚基同时连续表达，这可作为泰山赤鳞鱼特殊的遗传标记之一。

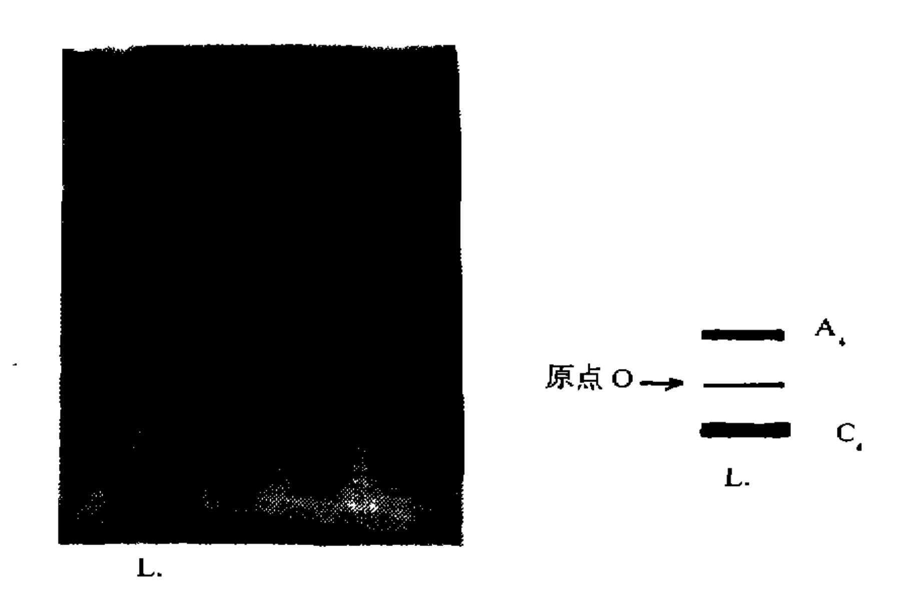


图 2　赤鳞鱼肝脏组织 LDH 同工酶琼脂糖凝胶电泳图及模式图

Fig. 2 Agarose electrophoretogram and a model of LDH isozymes expressed in liver of *Varicorhinus* sp.

L 肝脏

3.2 赤鳞鱼各组织基因表达与组织特异性

研究证明，LDH 同工酶属多基因位点同工酶，同工酶的结构由两个或两个以上的基因决定。一个基因编码一个多肽链，这些多肽链的分子量相同，但氨基酸排列顺序不同，因而构成各自不同的同工酶，这些不同的同工酶的基因受不同的因素控制(组织的组成、氧的饱和度以及激素、压力、温度等内外环境因子)可以不同时表达，各组织的表达也不同，因而导致不同组织 LDH 同工酶电泳图谱的特异性。心肌型的 LDH-B_4 同工酶虽然在 6 种组织中都存在，但在心肌中的染色强度、含量较高，LDH-B 亚基占优势。这是由于 B_4 同工酶和丙酮酸的亲和性大，使还原型辅酶 I(NADH)有效氧化呼吸作用得以持续地进行。因此，在心脏(肾、脑)这一类好气性组织中，LDH-B_4 同工酶大量存在，这对于需氧呼吸是适宜的。而在骨骼肌(肝)这一类兼气性组织中，A_4 同工酶占优势，具有无氧酵解的特性，这种 A_4 同工酶的分布特性是与赤鳞鱼对低氧环境有较高的适应能力，窒息点低，能在含氧量较低的水中生活，这一生理适应性相一致的。Ldh-C 基因仅在肝脏组

织中特异地表达，这对代谢最兴盛的肝脏是适应的。肝脏代谢能进行无氧酵解，也能有氧呼吸，通过糖代谢获得能量，LDH−C_4底物范围比其它同工酶广泛得多(梁志国，1985)，因而，LDH−C_4为肝脏代谢提供充足的能源。泰山赤鳞鱼表现出明显的组织特异性，是它的遗传标记之一。

3.3 肝脏LDH−C亚基只出现纯聚体(LDH−C_4)，为什么没有杂交体?

笔者认为：不同的亚基即使在同一细胞组分中合成，其基因却不可能在同一时间内开放，因此，不同的亚基没有杂交的机会。肝脏中无A，B亚基与C亚基杂交，可能是由于A、B亚基和C亚基合成不同步，而先合成的亚基没有机会或没有多余的亚基与后合成的亚基杂交。

上述结论，可为赤鳞鱼种群的生化遗传结构分析及人工选育种提供基础资料，为制定泰山赤鳞鱼原种的种质参数提供生化指标，也可为开发利用赤鳞鱼资源及建立和保护人工种质资源库及基因库提供理论依据。

参 考 文 献

李士鹏，1987 LDH同工酶的发生遗传学探讨．生物科学动态，(2)：14—18.

李永通等，1992 中国大鲵及鳖不同组织LDH同工酶的比较研究．动物学杂志，27(1)：28.

李达，1983．泰山赤鳞鱼的研究．山东农学院学报，(1)：1—3.

李思发等，1990．长江，珠江，黑龙江鲢，鳙，草鱼种质资源的研究．上海：上海教育出版社，55.

张庆朝等，1992 青山羊精子中LDH−X研究．山东农业大学学报，23(4)：249—252.

周顺伍，1992．生物化学实验技术．北京：北京农业大学出版社，92—95.

梁志国，1985．精子特异的酶，生殖与避孕，5(3)：3—7.

阎龙飞等．1987，基础生物化学 北京：农业出版社，123—124.

STUDIES ON THE LACTATE DEHYDROGENASE ISOZYMES OF *Varicorhinus* sp.

Zhang Qingchao Wang Hui Qing Zijuan
Zeng Yongqing Yue Yongsheng

(*Department of Animal Science, Shangdong Agricultural University, Taian* 271018)

Abstract

By use of polycrylamide gel electrophoresis. The patterns of expression of LDH isozymes were investigated in six differentialed adult tissue (eye, brain, heart, kidney, liver, and muscle) and the early developmental stages (from zero to 120 h after fertilizied) of *Vaicorhinus* sp. The results show that: ① During the early developmetal stages LDH−A genes and LDH−B genes exhibited at the same time. Five LDH zones were found. In com-

parison with most other teleosts, the patternes of expression of LDH isozymes of *Varicorhinus* sp. have its characteristic during the early developmental stages. The gene activities are equal between A and B. ② Isozymes genes in adult *Varicorhinus* sp. apparently exhibit a tissue-specific expression. The LDH-C gene is only present in liver and it migrates to the cathode. These's $LDH-C_4$. The above results provide basic information for the biochemical genetic survey of *Varicorhinus* sp. populations and artificial breeding of *Varicorhinus* sp.

Key words *Varicorhinus* sp., LDH isozymes, Electrophoresis, The patterns of characteristic development

(上接第 22 页)

审者的道德守则

1 重视期刊、恪尽职责

热爱科技事业，重视期刊工作、积极承担审稿任务、在学术上严格把关、确保期刊质量、促进出成果、出人才，推动科技进步、恪尽科技工作者的责任。

2. 严肃认真，严格要求

严格按照编辑部审稿标准和要求，根据国内外科技发展现状，客观、全面地评价文稿质量，评审意见明确具体、有理有据、用词确当。如发现违反稿约一稿两投，或有篡改、捏造、抄袭、剽窃、泄密嫌疑时，应提醒编辑部查明处理。

3. 公正无私，扶植新秀

审稿一视同仁、不以人论文、以文稿质量为唯一的评价标准。反对学术垄断、尊重作者学术见解，不轻易肯定或有意否定，不因学术观点异同而影响对文稿的评价。注意扶植新生力量和新生长点。与审者有直接利害关系的文稿，审者应主动回避。

4. 认真负责、及时审稿

按时保质保量完成审稿、不草率从事、不积压、拖延。如无法作出评价或不能按时完成，应立即将文稿退回编辑部或推荐他人评审。

5. 尊重作者、维护权益

对文稿内容要严加保密，不得向他人展示。如因评审需要、需向他人征求意见，应慎重对待，防止引起意外纠纷或侵仅行为。严禁借审稿之便，将尚未公开发表的文稿内容擅自引用或窃为己有。

编者的道德守则

1. 默默奉献，忠于职守

热爱编辑工作，献身期刊事业。认真贯彻办刊方针，紧密结合国家经济建设和科学技术的发展、组织、审选优秀文稿，按时按期编辑出版高质量的刊物。全心全意为促进学术交流、推动科技进步、出成果出人才服务。

2 一视同仁、不徇私情

尊重作者劳动成果，对来稿一视同仁。论文发表与否和先后，不受作者的身份、地位、资历、单位、地区或行政干预等其它因素的影响。文稿取舍的唯一标准和依据是文稿质量。坚持原则，秉公办事，不搞"关系稿"、"人情稿"，自觉抵制各种不正之风。编者本人的或编者与作者有直接利害关系的文稿，该编者应主动回避、将文稿交其他编者处理，不干预同行评审以及文稿的处理。

(下转第 79 页)